

Glycerokinase aus Oospora lactis
Isolierung und Eigenschaften
des Enzyms

Evamaria Kauder

1961

Verlag des Verfassers
Berlin, den 24. April 1892

**Die Eigenschaften des Körpers
bezüglich der Eigenschaften
des Raumes**

Von dem Verfasser
Dr. Hermann von Helmholtz
und dem Herausgeber
Dr. Hermann von Helmholtz
und dem Herausgeber
Dr. Hermann von Helmholtz

Verlag
Hermann von Helmholtz
und dem Herausgeber

München, 1892



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555618_0048

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

Glycerokinase aus *Oospora lactis*
Isolierung und Eigenschaften
des Enzyms

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Evamaria Kauder
aus Bremen

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. O. WIELAND
Korreferent: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan: Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1961



INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

II. Präparativer Teil

1. Standardisierung und Bestimmung der Glycerokinase-Aktivität.
2. Untersuchung verschiedener Mikroorganismen auf Glycerokinase-Aktivität.
3. Züchtung von *Oospora lactis*.
4. Anreicherung von Glycerokinase aus dem Mycel von *Oospora lactis*.

III. Eigenschaften des Enzyms

1. Stabilität
2. Hemmstoffe
3. Affinitätsverhältnisse
4. Elektrophoretische Untersuchungen

IV. Untersuchungen zum Stoffwechsel der Fruktose

V. Diskussion

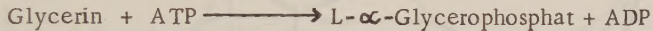
VI. Zusammenfassung

VII. Literatur

I. EINLEITUNG

Bei Versuchen über die Glycerinphosphorylierung wurde das Enzym Glycerokinase (GK^+) zum ersten Mal von Bublitz und Kennedy (1) aus Rattenleber angereichert. Später gelang es O. Wieland (2), GK aus Taubenleber anzureichern und zu kristallisieren. Die näheren Untersuchungen des Enzyms erbrachten seine Zugehörigkeit zu den Globulinen (2).

Das Enzym gehört nach der Einteilung von Hoffmann-Ostenhof (3) zur Gruppe der Transphosphorylasen. Es überträgt einen Phosphorsäurerest von der Adenosintriphosphorsäure (ATP) auf das Glycerin und führt dieses so in den intermediären Stoffwechsel ein:



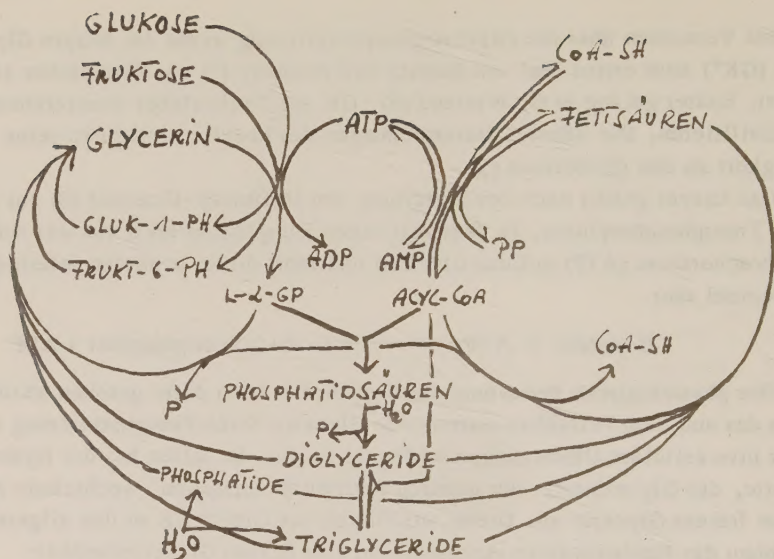
Die physiologische Bedeutung des Enzyms GK kann darin gesehen werden, dass es das aus dem Fettabbau stammende Glycerin durch Phosphorylierung wieder für intrazelluläre Umsetzungen verfügbar macht. So fallen bei der Hydrolyse der Fette, die Glycerinester der höheren Fettsäuren darstellen, wechselnde Mengen von freiem Glycerin an. Dieses wird durch das Enzym GK in den allgemeinen Abbau der Kohlenhydrate eingeschleust: Das Enzym Glycerophosphat-Dehydrogenase (GDH, Baranowski ferment) führt das dabei gebildete Glycerophosphat in Dihydroxyacetonphosphat (DOA-Ph) über, womit der Anschluss an den Abbauweg der Glukose im Embden-Meyerhof-Schema hergestellt ist.

Wie bereits seit längerer Zeit, besonders aus klinischen Beobachtungen beim Diabetes mellitus (4, 5,) bekannt ist, wird Fruktose im Tierkörper auf einem anderen Weg abgebaut als Glukose (6, 7, 8, 9, 10, 11). Nach Wolf und Leuthardt (12) soll hierbei freies Glycerin aus Glycerinaldehyd entstehen, welches nach Leuthardt (13) nach Phosphorylierung ebenfalls in den Embden-Meyerhof-Weg einmünden soll. Auf diesem Reaktionsweg käme dem Enzym GK somit für den Stoffwechsel der Fruktose besondere Bedeutung zu.

Die Phosphorylierung des Glycerins leitet aber nicht nur seinen oxydativen Abbau ein, sondern stellt auch die Voraussetzung für eine Reihe synthetischer Prozesse dar. So verläuft der Syntheseweg der Phosphatide und Neutralfette vom Glycerophosphat aus (15), das zunächst durch Veresterung mit höheren Fettsäuren in die entsprechende Phosphatidsäure umgewandelt wird, aus der dann nach Abspaltung eines Phosphates ein Phosphatid oder Neutralfett aufgebaut wird.

O. Wieland hat die Stellung der GK im Stoffwechsel der Kohlenhydrate und Lipide in einem Schema zusammengefasst: (16)

+) Abkürzungen siehe Seite 7



Infolge seiner hohen Substrataffinität war es O. Wieland möglich (17), mit dem Enzym Glycerokinase einen enzymatischen Test zur spezifischen Bestimmung von Glycerin aufzubauen. Diese Methode hat gegenüber älteren, chemischen Verfahren den Vorteil der besseren Handlichkeit und der unbedingten Spezifität. Schon kleinste Mengen Glycerin können mit grosser Genauigkeit in biologischem Material nachgewiesen werden.

Da Taubenleber (2) in der für die Herstellung von GK als Testenzym gewünschten Menge schwer zugänglich ist, und der Anreicherungsverfahren mit verhältnismässig hohen Verlusten der Gesamtkaktivität einhergeht, wurde nach anderen Quellen zur Darstellung von GK gesucht.

Nach intensiven Voruntersuchungen, auf die weiter unten noch näher eingegangen wird, gelang es schliesslich, in dem Mycel des Schimmelpilzes *Oospora lactis* ein Material zu finden, das bereits eine wesentlich höhere enzymatische Ausgangsaktivität als Leber zeigte. Es ergab sich daraufhin das Problem, diesen Pilz in grossem Masstabe zu züchten und das Enzym daraus in möglichst reiner Form zu isolieren. Diese Versuche verliefen erfolgreich und führten zu Präparaten mit einer spezifischen Aktivität von 20 000 bis 60 000 Enzymeinheiten pro mg Protein. Dies entspricht mehr als der doppelten Aktivität der reinsten, aus Taubenleber gewonnenen Fraktionen.

Neben diesen rein präparativen Arbeiten wurden mit dem gereinigten Enzym auch Untersuchungen über seine Eigenschaften und Kinetik angestellt.

In Tierexperimenten wurde das Enzym schliesslich für analytische Untersuchungen über den Stoffwechsel der Fruktose eingesetzt.

Die Versuche wurden auf Anregung von Prof. Dr. O. Wieland und mit Unterstützung der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt. Für diese Hilfe sei an dieser Stelle vielmals gedankt.

II. PRÄPARATIVER TEIL

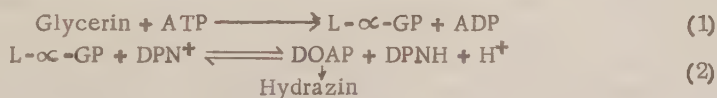
1. STANDARDISIERUNG UND BESTIMMUNG DER GLYCEROKINASE-AKTIVITÄT

In dieser Arbeit wurde zur Standardisierung und Bestimmung der Glycerokinase-Aktivität in allen Fällen nach der bei O. Wieland (2) angegebenen Methodik verfahren.

Bestimmung der GK-Aktivität:

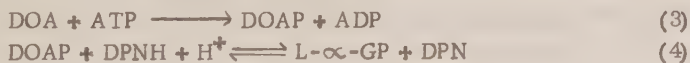
a) Mit Glycerin = Gly-Test. Die Bestimmung erfolgte nach der kombinierten optischen Methode mit der Glycerophosphatdehydrierung als Hilfsreaktion (18).

Hierbei wird in Gl. (1) gebildetes α -Glycerophosphat¹ mit Diphosphopyridinnukleotid am Enzym Glycerophosphatdehydrogenase zu Dioxyacetonphosphat umgesetzt, wobei hydriertes Diphosphopyridinnukleotid als optisch leicht zu fassendes Reaktionsprodukt (18) auftritt:



Das Gleichgewicht der Hilfsreaktion (Gl. 2) wird durch Abfangen des DOAP mit Hydrazin nach rechts verschoben. Ausserdem wird durch das stark alkalische Milieu des verwendeten Puffers durch Abfangen der H^+ das Gleichgewicht noch zusätzlich nach der rechten Seite der Gleichung 2 verlagert.

b) Mit Dioxyaceton = DOA-Test. Da das Enzym ausser mit Glycerin auch mit DOA reagiert (1), kann die Aktivitätsbestimmung auch auf umgekehrtem Wege nach folgendem Mechanismus erfolgen:



Dieser Weg bringt den Vorteil mit sich, dass im neutralen Bereich und ohne besondere Abfangvorrichtungen gearbeitet werden kann. Da aber Glycerin schon

¹Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, L- α -GP = L- α -Glycerophosphat, DOAP = Dioxyacetonphosphat, DOA = Dioxyaceton, DPN = Diphosphopyridinnukleotid, DPNH = hydriertes Diphosphopyridinnukleotid, GK = Glycerokinase, GDH = Glycerophosphatdehydrogenase, ÄDTA = Äthylen-diamintetraacetat (K-Salz)

in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ eine Hemmung von 40% bewirkt, ist dieser Test nicht anwendbar für Enzymfraktionen, denen aus Stabilisierungsgründen Glycerin zugesetzt wurde.

Dieser Test wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich bei der Bestimmung der Michaeliskonstanten für DOA benutzt.

Standardisierung der Enzymaktivität:

Nach den beiden genannten Testverfahren wurde als eine Enzymeinheit diejenige Proteinmenge definiert, die unter den angegebenen Bedingungen eine Extinktionsänderung von 0,001 pro Minute herbeiführt. Die spezifische Enzymaktivität ist durch das Verhältnis von Einheiten pro 1 mg Protein ausgedrückt. Die Proteinbestimmung wurde im allgemeinen nach der Biuret-Methode (19), in einigen Fällen durch Extinktionsmessung im Ultraviolettbereich bei 280 und 260 m μ (20) durchgeführt. Beide Verfahren ergaben recht gute Übereinstimmung der Werte.

Lösungen:

1) Für Gly - Test: Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH 9,8 mit Mg^{++} : 20,8 gr Hydrazinhydrat Merck 24%, 1,5 g Glykokoll 0,2 ml 1 M MgCl_2 werden mit Wasser und einigen Tropfen 10 n KOH zur Einstellung eines pH = 9,8 auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Dieser Puffer ist an Hydrazin 1 M, an Glykokoll 0,2 M, an Mg^{++} 0,002 M.

Glycerin 0,1 M: 0,921 g mehrmals destilliertes Glycerin ad 100 ml Wasser gelöst.

2) Für DOA - Test: 0,05 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,15 enthaltend Mg^{++} (=Tram-Puffer): 0,76 g Triäthanolamin und 0,2 ml 1 M MgCl_2 mit Wasser und wenig 2 n HCl auf pH 7,15 und ein Endvolumen von 100 ml bringen.

DOA 0,1 M: 0,09 g Dioxyaceton dimer (Th. Schuchardt, München) ad 10 ml Wasser gelöst.

3) Übrige Reagentien: $\text{ATP}:\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$ Boehringer. Die Gehaltsbestimmung nach zwei verschiedenen enzymatischen Methoden ergab übereinstimmend einen Reinheitsgrad von etwa 75%. Das Präparat Boehringer wurde mit 2 n NaOH neutralisiert.

DPN: 75 % DPN der Firma Boehringer, Mannheim. (DPN-75)

DPNH: DPN "reinst" Boehringer

GHD: GDH Boehringer

Ausführung des Glycerokinase-Testes:

In eine Cuvette mit der Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ pipettiert man hintereinander: 1,80 ml Puffer, 0,05 ml ATP 0,05 ml 0,02 M DPN bzw. 0,006 M DPNH, 0,02 ml GDH (=40 Protein) und GK-Fraktion entsprechend etwa 30-60 Einheiten.

Die Verdünnung höher gereinigter Fraktionen geht mit einer sehr raschen Inaktivierung des Enzyms einher. Es hat sich deshalb bewährt, der Verdünnungslösung ausser ÄDTA 0,001 M noch 0,01% Serumalbumin (Behring-Werke) zuzusetzen.

Alle Bestimmungen wurden bei konstanter Temperatur (+25°C) durchgeführt.

Für die Messungen wurde das Photometer "Eppendorf" mit einem wasserdurchströmten, thermokonstanten Cuvettenhalter verwendet.

2. UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER MIKROORGANISMEN AUF GLYCEROKINASE-AKTIVITÄT

Auf der Suche nach einer günstigen Ausgangsquelle für die Darstellung von GK wurden verschiedene Hefen auf ihren Gehalt an GK-Aktivität getestet.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte zunächst mit Toluol: Die Hefe wird im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Toluol versetzt (auf 1 g Hefe 0,06 ml Toluol). Nach 45 Minuten setzt man Wasser hinzu (auf 1 g Hefe 0,04 ml Wasser), nach weiteren 45 Minuten noch einmal kaltes Leitungswasser (auf 1 g Hefe 1 ml Wasser). Der Ansatz bleibt 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, am 4. Tag wird zentrifugiert. Man gewinnt einen klaren, bernsteingelben Rohextrakt.

Die untersuchten Hefen, käufliche Bäckerhefe (Giegold- und Wienerhefe der Firma Hefe-Mayer, München) und eine Wildhefe (Torulahefe) zeigten gar keine oder nur sehr geringe GK-Aktivität. Schwankungen der Aktivität traten innerhalb der verschiedenen Chargen auf, und waren nicht von den untersuchten Heferassen abhängig.

Auch andere Aufschlussverfahren, wie Maceration von luftgetrockneter Hefe durch mehrstündige Inkubation in M/20 Phosphatpuffer (pH = 7,0) bei 37°C, mechanische Zertrümmerung der Hefezellen im Zellhomogenisator Modell MKS, Fa. Braun, Melsungen, (21), oder Trocknung der Hefezellen mit Aceton und anschließendem Aufschluss der im Mörser zu Pulver zerriebenen Zellen in M/20 Phosphatpuffer, pH = 7,0, brachten keine Rohextrakte mit befriedigenden Ausgangsaktivitäten.

Deshalb wurde zu Versuchen übergegangen, die GK-Aktivität der Hefezellen durch Züchtung oder Adaptation in einem Nährmedium zu steigern, das als einzige Kohlenstoffquelle Glycerin enthielt.

Der Vorgang der Enzymadaptation wurde zuerst im Jahre 1882 von J. Wortmann (22) gezeigt, der Mikroorganismen durch die Anwesenheit entsprechender Substrate im Kulturmedium zur Bildung gewisser Enzyme anregen konnte.

In neuerer Zeit haben Kalckar und Mitarbeiter (23) gewöhnliche Hefe (*Saccharomyces fragilis*) an Galaktose adaptiert, und dabei eine beträchtliche Anreicherung der für den Galaktosestoffwechsel verantwortlichen Enzyme beobachtet.

Auf ähnliche Weise konnte es auch möglich sein, eine Erhöhung der GK-Aktivität zu erreichen, indem die Hefezellen gezwungen wurden, ihren C-Bedarf ausschliesslich auf dem Wege über die Glycerinphosphorylierung zu decken. Allerdings ist bei Mikroorganismen auch ein Ferment bekannt, (24, 25, 26), das Glycerin direkt, ohne Beteiligung von ATP, zu DOA dehydriert:



Dieser Vorgang ist reversibel. Bei der Rückreaktion kann ausser DOA auch

Glycerinaldehyd als Wasserstoffakzeptor fungieren (24).

Es war bei den Adaptationsversuchen also damit zu rechnen, dass die Hefe auch ohne GK-Adaptation das Glycerin verbrauchte. Deshalb war gleichzeitig zu prüfen, ob nicht an Stelle von GK das Enzym dieser direkten Oxydation vorwiegend gebildet würde.

Züchtung von Bäckerhefe auf Glycerin:

Die verwendete Nährlösung enthielt auf 5 l Wasser: 4,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5 g K_2HPO_4 , 250 mg CaCl_2 , 250 mg MgCl_2 , eine Spatelspitze FeCl_2 und wurde mit wenig Hefe angeimpft.

Die Adaptation erfolgte schrittweise, d. h. der Lösung wurde zunächst noch Glukose zugesetzt. In den folgenden Passagen wurde die Glukose-Konzentration erniedrigt, die Glycerinkonzentration erhöht, bis schliesslich in den letzten Passagen nur noch Glycerin den Hefezellen als C-Quelle zur Verfügung stand. Die Kulturen wurden während ihres Wachstums ständig mit Luft beatmet und bei Zimmertemperatur gehalten.

Nach ausreichendem Wachstum wurden die Hefezellen durch Zentrifugieren von der Nährlösung abgetrennt und dann an der Luft getrocknet. Der Aufschluss der getrockneten Zellen erfolgte durch Maceration in M/20 Phosphatpuffer (pH=6,5) bei 37°C.

Die Ergebnisse dieser Züchtungsversuche waren sehr unterschiedlich. Die GK-Aktivität der Rohextrakte aus der innerhalb der ersten Woche gewachsenen Kulturen stieg sehr schön an. Im weiteren Verlauf der Züchtung hingegen sank sie wieder, mitunter bis auf Null, herab. Dabei zeigten die Kulturen makroskopisch und mikroskopisch eine zunehmende Verunreinigung.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche stand jetzt fest, dass sich grundsätzlich durch das Züchtungsverfahren eine Erhöhung der GK-Aktivität erreichen liess.

Der Test auf Glycerindehydrase ergab bei den Rohextrakten im Vergleich zu der gefundenen GK-Aktivität nur sehr niedrige Werte. Die Glycerindehydrase-Aktivität stieg mit der zunehmenden Verunreinigung der Kulturen nicht an.

Testansatz zur Bestimmung der Glycerindehydrase-Aktivität: In eine Cuvette von der Schichtdicke $d = 1$ cm pipettiert man hintereinander: 1,8 ml 0,1M Glykollpuffer (pH = 7,9), 0,05 ml DPN 0,02 M, 0,05 ml Glycerin 0,1M, Rohextrakt je nach Gehalt an Aktivität.

Das unterschiedliche Verhalten der GK-Aktivitäten in den verschiedenen Züchtungsansätzen, und das zum Teil völlige Absinken nach einiger Zeit Wachstum, konnte folgende Gründe haben: Entweder adaptierte sich die Hefe tatsächlich und wurde dann von anderen, weniger, bzw. gar keine GK-Aktivität zeigenden Mikroorganismen überwuchert. Oder aber der Hefe waren von vorne herein andere Organismen in wechselnder Zahl beigemischt, die bereits von Natur aus eine hohe GK-Aktivität aufweisen.

Bei der Klärung dieser Frage, die wir mangels Erfahrung nicht alleine lösen konnten, half uns freundlicherweise Herr Dr. O. Kandler, Institut für Landwirtschaft

und Brauereiwesen der Technischen Hochschule München in Weihenstephan, Freising/Obb., dem an dieser Stelle hierfür vielmals gedankt sei.

Er fand in unseren Suspensionen von Bäckerhefe ausser Hefezellen Konidien von *Oospora lactis*, Zellen einer Wildhefe und Bakterien. Alle diese Zellen, besonders die Konidien von *Oo. lactis*, waren in den Suspensionen von Bäckerhefe, die bereits auf Glycerin gewachsen war, im Verhältnis zu den Bäckerhefzellen vermehrt.

Wir züchteten deshalb eine Reinkultur von *Oo. lactis* weiter, und fanden in dem aus einem Lyophilisat des Mycels gewonnen Rohextrakt sehr schöne GK-Ausgangsaktivitäten.

Diese Ergebnisse veranlassten uns, *Oo. lactis* als Ausgangsmaterial bei der Anreicherung von GK zu verwenden.

3. ZÜCHTUNG VON OOSPORA LACTIS

Hierbei wurde das schon weiter oben bei der Hefezüchtung angegebene Nährmedium verwendet. Die Lösung enthielt auf 5 l Wasser: 4,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5 g K_2HPO_4 , 250 mg CaCl_2 , 250 mg MgCl_2 , eine Spatelspitze FeCl_2 und wurde mit *Oo. lactis* angeimpft und bei Zimmertemperatur inkubiert.

Aus technischen Gründen wurde die Züchtung des Pilzes später von der Biochemischen Abteilung der Firma Boehringer, Tutzing, im grossen Masstab durchgeführt.

4. ANREICHERUNG VON GLYCEROKINASE AUS OOSPORA LACTIS

Der Anreicherungsang wurde mehrmals durchgeführt, und ergab jedesmal 40-60fache Steigerung der Ausgangsaktivität. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind auf Schwankungen im Enzymgehalt des bei der jeweiligen Anreicherung verwendeten Pilzmycels zurückzuführen.

Im Anfangsstadium der Versuche wurde selbst gezüchtetes Mycel verwendet. (Siehe das oben angegebene Verfahren). Da sich aber die Züchtung unter unseren gegebenen Bedingungen als zu wenig ergiebig gestaltete, und es deshalb für uns unmöglich war, die für den Anreicherungsang notwendigen Mengen zu gewinnen, machten wir gerne von dem Angebot Gebrauch, das Mycel bei der Firma Boehringer, Tutzing, züchten und gefriertrocknen zu lassen. Die endgültige Anreicherung erfolgte dann mit von der Firma Boehringer gezüchteten *Oo. lactis*.

Alle Arbeitsgänge wurden bei $+4^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Lösungen enthielten, wenn nicht anders vermerkt, ÄDTA in einer Endkonzentration von 0,001M, Glycerin wurde im allgemeinen in einer Endkonzentration von 0,01M zur Stabilisierung des Enzyms zugesetzt.

1) Extraktion. Das Lyophilisat (gr) wird mit dem 10-fachen Volumen (ml) K_2HPO_4 0,05M, unter mechanischem Rühren im Wasserbad bei 37°C aufgeschlossen. Die Extraktion dauert 3 Stunden. Die festen Bestandteile werden abzentrifu-

giert, mit dem 5-fachen des Ausgangsvolumens aufgenommen, und weitere 2h unter mechanischem Rühren bei 37°C inkubiert. Erneutes Zentrifugieren und Vereinigung der Überstände. Nach Abzweigen einer kleinen Probe dieses Rohextraktes für den Enzymtest wird ÄDTA in einer Endkonzentration von 0,001M und Glycerin in einer Endkonzentration von 0,01M zugesetzt.

2) Hitzedenaturierung inaktiven Proteins. Der Rohextrakt wird 60 Minuten unter mechanischem Rühren in ein temperaturkonstantes Wasserbad von 60°C gebracht und anschliessend sofort auf 0°C abgekühlt. Das inaktive Protein lässt sich durch Zentrifugieren leicht abtrennen, der Niederschlag wird nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate stellen eine etwas opale, gelb gefärbte Eiweisslösung dar.

3) Geladsorption. Zur Lösung von Schritt 2 gibt man 0,2 Volumen Phosphatgel (27):1 g Trockensubstanz auf 1 gr Protein. Es empfiehlt sich, diesem Schritt einen Vorversuch mit einer kleinen Probe vorzuschicken. Nach Abzentrifugieren ist die Lösung ganz klar. Sie soll noch etwa 85-90% der Ausgangsaktivität enthalten.

4) Ammonsulfatfällung. Der Überstand aus Schritt 3 stellt eine stark verdünnte Eiweisslösung dar, deshalb schliesst sich eine Konzentration mit AS an. Die gesamte Enzymaktivität wird ausgefällt, indem man festes AS bis zu einer Sättigung von 70-75% langsam hinzugibt. Das Ganze wird einige Stunden stehen gelassen (im Kühlraum) und dann zentrifugiert. Den Niederschlag wäscht man mit 75% AS in 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,5 aus.

5) Fraktionierte Elution: Der Niederschlag wird nun mit Lösungen fallender AS-Konzentration jeweils 30 Min unter mechanischem Rühren bei 0°C eluiert. Man beginnt mit 50% AS in 0,01M Phosphatpuffer pH 6,5, zentrifugiert, wiederholt den ganzen Vorgang mit 40% AS in 0,01M Phosphatpuffer pH 6,5. Der restliche Niederschlag, der die Hauptaktivität enthält, wird 3 x mit 30% AS in 0,01M Phosphatpuffer pH 6,5 jeweils 30 Minuten unter mechanischem Rühren eluiert. Man vereinigt die Überstände aus den Fraktionen 40% und 30% AS.

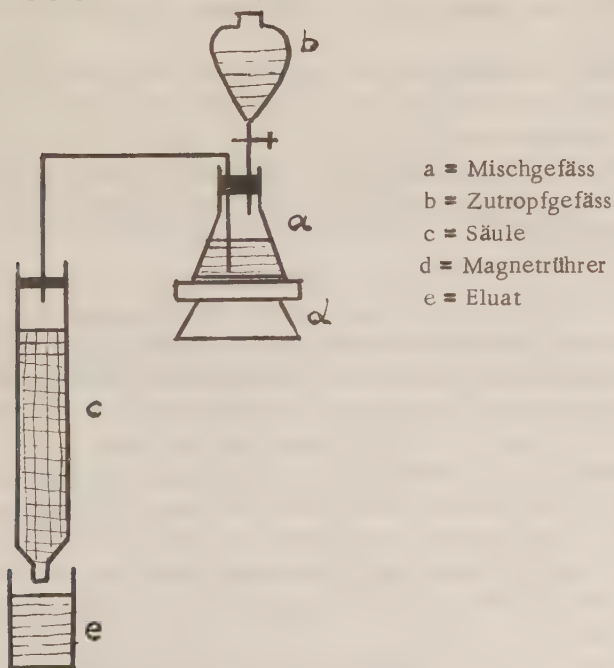
Um das Volumen für die nun folgende Dialyse möglichst klein zu halten, wird die Enzymaktivität aus den vereinigten Überständen durch Zugabe von AS bis zu einer Sättigung von 60% ausgefällt, und der Niederschlag konzentriert in 0,01M Ph-Puffer pH 6,5 aufgenommen.

6) Dialyse. Die nun folgende Dialyse bringt keine Anreicherung, sondern einen geringen Rückgang der spezifischen Aktivität. Sie dient dazu, die Proteinlösung für die Säulenpassage salzfrei zu machen. Die Dialyse dauert 6 Stunden und erfolgt gegen den Beladungspuffer der Säule: 0,005M K-Phosphat pH 6,5, enthaltend 0,01 M Glycerin und 0,001M Trilon Endkonzentration.

7) Chromatographie an DEAE-Cellulose. Der nächste Reinigungsschritt erfolgt durch Adsorption der Eiweisslösung an DEAE-Cellulose und anschließender Elution durch steigende Salzkonzentration bei gleichbleibendem pH. ^{*)}

Die DEAE-Cellulose (Hersteller: SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde folgendermassen vorbereitet:

1. Cellulose in Wasser (etwa 10faches Volumen) aufschlemmen.
2. Dekantieren und mit 1 n NaOH versetzen. Absitzen lassen, dekantieren, den ganzen Vorgang etwa 3 x wiederholen.
3. Drei- bis viermal mit destilliertem Wasser waschen.
4. In die Säule überführen, deren Grösse sich nach der Menge des später aufzutragenden Proteins richtet. Bei geschlossenem Hahn absitzen lassen, dann mit dest. H_2O waschen, bis das pH des Eluates etwa 7,5 beträgt.
5. Die Cellulose aus der Säule in ein Becherglas überführen und dort solange mit 0,2 M K-Phosphatpuffer waschen, bis der klare Überstand das gewünschte pH hat.
6. Einmal mit H_2O waschen.
7. In der Säule mit 0,005 M K-Phosphat-Puffer des gewünschten pH equilibrieren.
8. Die ausgiebig gegen den Beladungspuffer dialysierte Proteinlösung auftragen.



Skizze zur Durchführung der Gradientenmethode.

^{*)} Ich möchte mich an dieser Stelle vielmals bei Herrn Lorch, Institut für Zellchemie, Max-Planck-Institut München, für seine freundlichen Ratschläge bei der Anwendung dieser Methode bedanken.

Die Elution erfolgt nach der Gradientenmethode. Dabei lässt man aus einem Mischgefäß, das 0,05M NaCl in 0,01M K-Phosphatpuffer pH=6,5, 0,01M Glycerin und 0,001M Trilon (Endkonzentration) enthält, und in das kontinuierlich aus einem anderen Gefäß 2/3M NaCl in 0,01M K-Phosphatpuffer pH=6,5 enthaltend 0,01M Glycerin und 0,001M Trilon, hinzutropft, die Elutionslösung langsam auf die Säule laufen.

Die Elution der GK-Aktivität enthaltenden Fraktionen erfolgt bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,16 - 0,24 M. Die Berechnung erfolgt nach: (28).

8) Konzentration mit AS und Dialyse. Als nächster Reinigungsschritt schliesst sich eine Passage durch eine Hydroxyl-Apatit-Säule an (Schritt 9). Da das Eluat aus der DEAE-Cellulose eine sehr verdünnte Eiweisslösung darstellt, wird die gesamte Enzymaktivität durch die Zugabe von AS bis zu einer Sättigung von 60% ausgefällt. Der Niederschlag wird konzentriert aufgenommen und dann gegen 0,001M Na-Phosphat pH=6,8, enthaltend 0,01M Glycerin und 0,001M Trilon, 6 Stunden dialysiert.

9) Reinigung an Hydroxyl-Apatit. Hydroxyl-Apatit wird nach (29) hergestellt. Die Elution erfolgt durch steigende Phosphatkonzentration bei gleichbleibendem pH. Den Waschlösungen wurde immer 0,01M Glycerin und 0,001M Trilon zugesetzt.

Man eluiert zunächst mit 0,05M Na-Phosphatpuffer pH=6,8 bis das Eluat kein Eiweiss mehr enthält, dann mit 0,1M Na-Phosphatpuffer pH=6,8, zum Schluss mit 0,2M Na-Phosphatpuffer pH=6,8.

Die GK-Aktivität enthaltenden Eluate werden vereinigt, und die gesamte Enzymaktivität mit AS, das man bis zu einer Sättigung von 60% hinzugibt, ausgefällt. Der Niederschlag wird in einer 2,4M AS-Lösung aufgenommen und in der Kühltruhe bei -20°C aufgehoben.

10) Kristallisationsversuche. Kristallisationsversuche wurden wiederholt unternommen, indem zu den hochgereinigten Fraktionen sehr langsam und vorsichtig doppelt umkristallisiertes AS zugesetzt wurde. Dabei kam es mehrere Male zum Auftreten von "Seidenglanz"; der aber immer nur sehr schwach war, und sich auch nicht durch Umkristallisieren verstärken liess.

Bei Messung des UV-Spektrums dieser hochgereinigten Fraktionen ergab der Quotient 280/260 μ konstant Werte um 1, was einem Nukleinsäuregehalt von 3,5% entspricht. Die Messung der UV-Absorption stellt eine von Casparson entwickelte Methode dar, und beruht auf der selektiven Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen bei 260 μ , und der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin bei 280 μ (20).

Dieser hohe Gehalt an NS unserer Enzymfraktionen mag an den erfolglosen Kristallisationsversuchen Schuld sein, zumal die GK aus Taubenleber bereits bei einer spezifischen Aktivität von 23 800 E/mg Protein kristallisierte, Werte, die bei unserem Anreicherungsangang von GK aus *Oospora lactis* zum Teil weit überschritten wurden.

Versuche, die NS abzutrennen, verliefen ebenfalls erfolglos. Versucht wurden die üblichen Methoden mit Protaminsulfat und MnCl_2 . Auch die jeweiligen Säulenpassagen hatten keinen Einfluss auf den Quotienten 280/260, der auch in den Eluaten unveränderte Werte zeigte.

An Fremdaktivitäten wurden in höchstgereinigten Fraktionen die Aktivität auf Alkoholdehydrase und Glycerindehydrase untersucht. In beiden Fällen zeigte sich keine Aktivität.

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über das gesamte Anreicherungsverfahren.

TABELLE 1
Übersicht über das Anreicherungsverfahren

Fraktion	Vol.	Ges. - Einheit.	Ges. - Protein	spez. Aktivität	Ausbeute
Gesamtextrakt	3130 ml	$1,5 \cdot 10^7$	10,00 g	1500	100 %
nach Erhitzen	2850 ml	$9,7 \cdot 10^6$	1,23 g	7500	65 %
nach Geladsorpt.	2900 ml	$8,7 \cdot 10^6$	0,99 g	8800	58 %
nach AS	49 ml	$8,8 \cdot 10^6$	0,55 g	16000	58 %
nach Dialyse	29 ml	$6,4 \cdot 10^6$	0,55 g	11600	42 %
vereinigte Eluate n. DEAE ⁺⁾	57 ml	$5,5 \cdot 10^6$	0,138g	40000	36,5%
nach Dialyse	19,5ml	$5,6 \cdot 10^6$	0,136g	40000	36,5%
nach Hydroxyl- Apatit ⁺⁺⁾	7,5ml	$4,95 \cdot 10^6$	78 mg	63000	33 %

⁺⁾ und ⁺⁺⁾: weniger ergiebige Vorfraktionen blieben unberücksichtigt.

Die Kristallisation der GK aus *Oo. lactis* gelang in der vorliegenden Arbeit nicht. Deswegen konnten alle folgenden Untersuchungen systematischer Art nur am hochgereinigten Enzym durchgeführt werden. In der Zwischenzeit ist das Enzym GK aber aus einem anderen Mikroorganismus, *Candida mycoderma*, kristallisiert worden (30).

III. EIGENSCHAFTEN DES ENZYMS.

1. STABILITÄT

a) Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur:

Die Stabilität des Enzyms wurde in 0,01M Phosphatpuffer pH=6,0, enthaltend 2,4M AS bei verschiedenen Temperaturen untersucht: Zimmertemperatur, 0°C und -20°C.

Die Stabilität erwies sich als ausserordentlich hoch. Bei sechswöchiger Lagerung bei den oben angegebenen Temperaturen war kein signifikanter Aktivitätsverlust nachweisbar.

b) Stabilität in Abhängigkeit vom pH: (s. Abb. 1)

Die Enzymlösung wurde mit quarzdest. Wasser, enthaltend 0,17 mM Na-Acetat/ml verdünnt und an der Glaselektrode mit 2n NaOH auf das entsprechende pH eingestellt und anschliessend 6 Std. bei +4°C belassen. Die grösste Stabilität zeigte sich im Bereich zwischen pH 6,0-7,0.

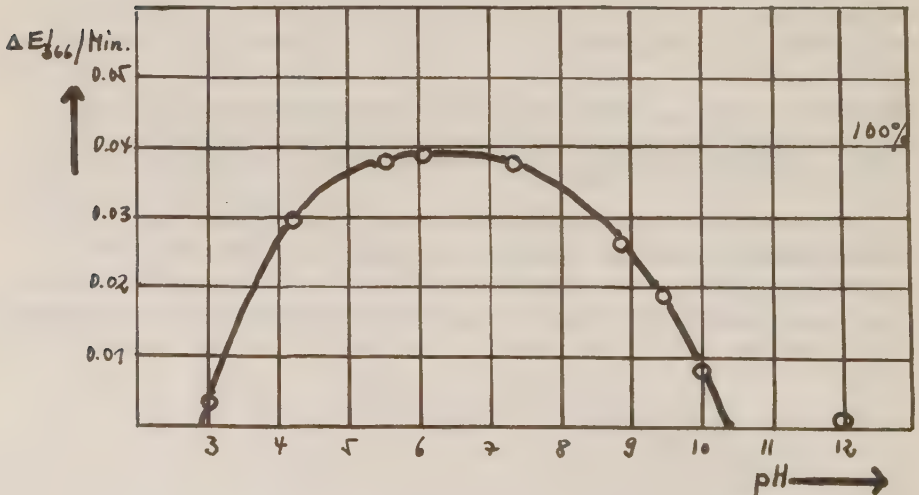


ABBILDUNG 1
pH-Stabilität der GK aus *Oo. lactis*

2. HEMMBARKEIT DER GK.

Untersuchungen an GK aus Taubenleber hatten eine partielle Reaktivierung des Enzyms durch Cystein ergeben (2). Dadurch wurde die SH-Natur des Enzyms wahrscheinlich gemacht.

Auch die GK aus *Oo. lactis* scheint der Gruppe der SH-Enzyme anzugehören, wie Versuche über die Hemmbarkeit mit p-chlor-mercuri-benzoat zeigten.

Der Hemmstoff wurde in verschiedenen Konzentrationen zu dem üblichen Testansatz gegeben und 4 Minuten bei +25°C inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde dann anschliessend 5 Minuten lang im minütlichen Abständen verfolgt. Hierbei zeigte sich, dass bereits bei einer Endkonzentration von 10^{-8} M p-chlor-mercuri-benzoat im Testansatz eine Hemmung auftritt. Die Hemmung ist vollständig bei einer Endkonzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M p-chlor-mercuri-benzoat im Testansatz. Bei diesen Konzentrationen von p-chlor-mercuri-benzoat wird das ebenfalls an der Reaktion beteiligte Enzym GDH nicht wesentlich gehemmt (O. Wieland, persönliche Mitteilung).

Die Hemmung ist in der Tabelle 2 und in der Abbildung 2 dargestellt.

TABELLE 2
Hemmung der GK durch p-chlor-mercuri-benzoat

Reaktionsgeschwindigkeit $\Delta E_{366}/\text{Min}$	% Hemmung	Hemmstoffkonzentration
32	0	$3 \cdot 10^{-9}$ Mol/l
30	3	$3 \cdot 10^{-8}$
29	6,5	$8 \cdot 10^{-7}$
20	35,5	$3 \cdot 10^{-7}$
11	89,5	$6 \cdot 10^{-6}$
0	100,0	$3 \cdot 10^{-6}$

3. AFFINITÄTSVERHÄLTNISSE.

Das Enzym GK aus *Oospora lactis* phosphoryliert ebenso wie das aus Taubenleber- ausser Glycerin auch Dioxyceton. Es wurden die Michaeliskonstanten für Glycerin, DOA und ATP bestimmt.

Entsprechend der Darstellung nach Lineweaver und Burk (31) beträgt die Michaeliskonstante für Glycerin $5,5 \cdot 10^{-5}$, für DOA $3,3 \cdot 10^{-4}$, bei Substratsättigung mit Glycerin wurde für ATP die Michaeliskonstante von $8,3 \cdot 10^{-5}$ gefunden (siehe Abb. 3).

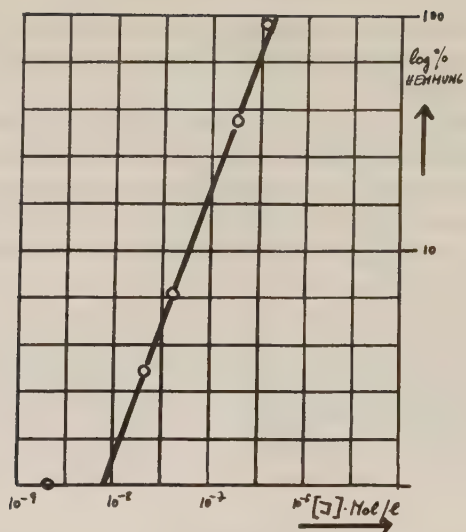


ABBILDUNG 2
Hemmung der GK durch p-chlor-mercuri-benzoat

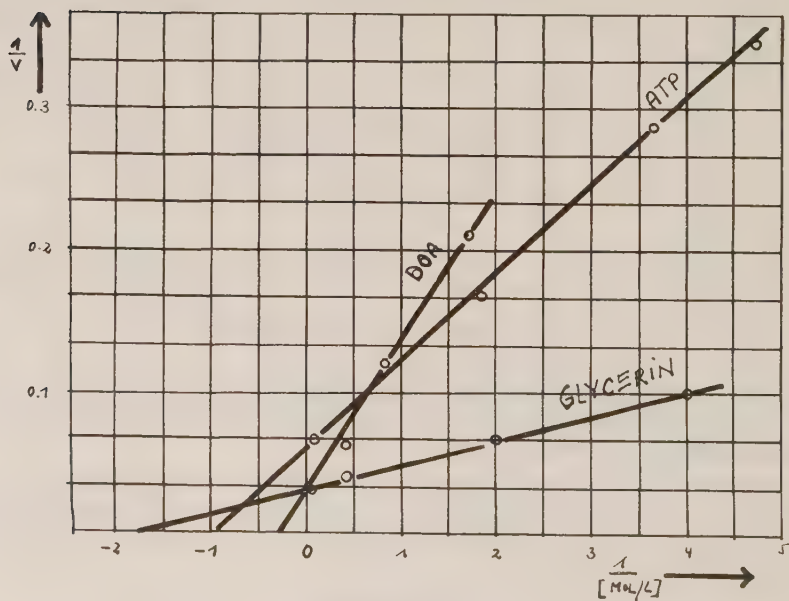


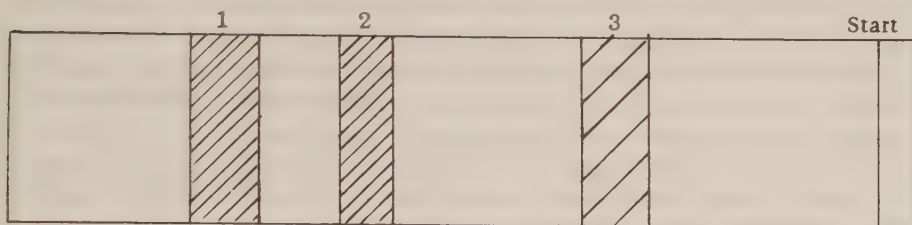
ABBILDUNG 3
Michaelis-Konstanten für Glycerin, ATP und DOA in der Darstellung nach Lineweaver und Burk

4. PAPIERELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN.

Das Enzym GK wurde in höher gereinigtem Zustand papierelektrophoretisch nach der in der Klinik üblichen Methode untersucht (49).

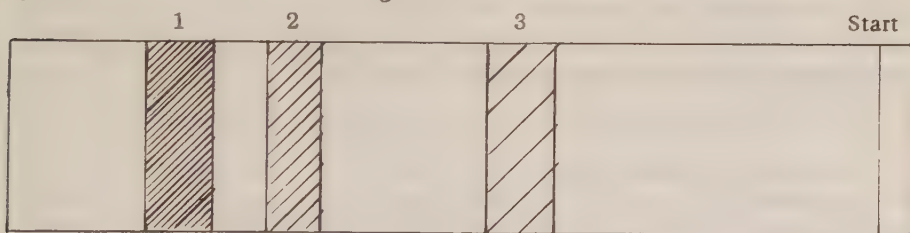
Verwendet wurde Papier der Firma Schleicher & Schüll No 2043 b, auf das die Proteinlösung aufgetragen und in Veronalpuffer pH 8,6 über Nacht 12-15 Stunden laufen gelassen wurde.

Bei wiederholter Untersuchung verschiedener Fraktionen stellten sich konstant 3 Banden dar. Welche Bande die Enzymaktivität enthaltende war, konnte nicht nachgewiesen werden, da das Enzym GK bei einem pH von 8,6 keine Aktivität mehr zeigt. Bei einem für das Enzym günstigeren pH gelang die Auftrennung nicht.



Elektrophoresediagramm 1

spezifische Aktivität 20 000 E/mg Protein



Elektrophoresediagramm 2

spezifische Aktivität 30 000 E/mg Protein

Die Bande 1 erscheint gegenüber der Bande 1 des ersten Diagramms verstärkt.

IV. UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL DER FRUKTOSE

Im folgenden wurde das aus *Oospora lactis* angereicherte Enzym für Untersuchungen zum Stoffwechsel der Fruktose herangezogen. Hierzu sollten Experimente von O. Wieland (17) reproduziert werden, die nach intraperitonealer (i. p.) von Fruktose einen Anstieg von Glycerin in Leber und Blut von Ratten ergeben hatten. Diese Experimente befassten sich mit der Frage, ob in vivo tatsächlich aus Glycerinaldehyd Glycerin entstehen kann.

Glycerinaldehyd entsteht nach Leuthardt (32) beim Abbau der Fruktose durch die Frukt-Aldolase-Reaktion und wird nach seinem Vorschlag (12) durch die Glycerindehydrase zu Glycerin hydriert. Die hierbei wirksame Glycerindehydrase wurde von ihm (33) beschrieben und soll nach Holzer und Schneider (34) mit der Alkoholdehydrase der Leber (ADH) identisch sein.

Der von Hers und Kusaka (35) in Aussicht genommene Weg, wonach der Glycerinaldehyd schon auf dieser Stufe der C_3 -Fragmente durch eine Triosekinase direkt in den Stoffwechsel der Glukose einmünden sollte, liess sich also hier wie auch sonst nicht bestätigen, da die Existenz eines derartigen Enzyms nicht sicher gestellt werden konnte. Vielmehr soll der beim Abbau der Fruktose entstehend freie Glycerinaldehyd nach Leuthardt, wenn überhaupt, erst nach dem Umweg über das Glycerin und das Glycerophosphat in das Phosphodioxyaceton und den Abbauweg der Glukose überführt werden (siehe Schema Weg 1). Hierbei soll das Glycerin durch die von Bublitz und Kennedy gefundene und in der vorliegenden Arbeit angereicherte GK aktiviert werden. Dieses spätere Einmünden der Abbauprodukte der Fruktose in den Glukosestoffwechsel war ja auch durch viele andere Untersuchungen (6, 7, 8, 9, 10, 11) und besonders durch die Erfahrungen aus der Klinik (4, 5) nahegelegt worden, wonach die Fruktose auch noch bei der diabetischen Stoffwechsellage abgebaut werden kann, was nur auf einem von dem der Glukose verschiedenen Abbauweg möglich ist.

In anderen Untersuchungen von Leuthardt, Testa und Wolf (36), sowie von Hölzer und Holldorf (37) zeigte sich jedoch noch ein ganz anderer Reaktionsweg des Glycerinaldehyds, bei dem derselbe zusammen mit DOAP einer Dismutation in Glycerinsäure und α -Glycerophosphat unterliegen soll:

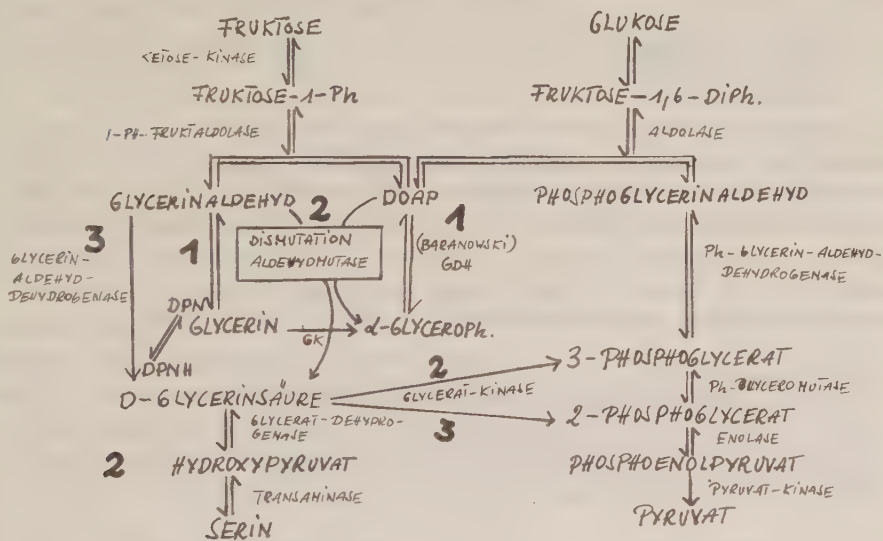


Die Natur des betreffenden Enzyms ist noch nicht völlig bekannt, jedoch hält Leuthardt (13) für möglich, dass es sich dabei um das von Green, Needham und Dewan (38) beschriebene Enzym "Aldehydmutase" handelt. (Siehe Schema Weg 2). Leuthardt vermutete auch, dass die so entstehende Glycerinsäure über Hydroxypyruvat in Serin übergeführt werden könnte mit Hilfe eines von Ischihara mit Greenberg (39) mitgeteilten Enzympräparates aus Rattenleber. Auch Diamantstein und Lamprecht (40) haben aus Lebermitochondrien ein Enzym "Glyceratdehydrogenase" isolieren können, und schliesslich fanden auch Holzer und Holldorf (41) ein derartiges Enzym im Spinat. Der Hauptweg, auf dem der Glycerinaldehyd in der Leberzelle weiterreagiert, soll aber nach Leuthardt (13) die Reduktion zum Glycerin darstellen.

Demgegenüber misst jedoch Holzer (42) dem von ihm und Holldorf (37), Black und Wright (43), sowie Ichihara und Greenberg (44) beschriebenen Enzym "Glyceratkinase", das Glycerinsäure in 3-Phosphoglycerinsäure umwandelt, eine grössere Bedeutung zu (Siehe Schema Weg 2).

Schliesslich gelang es Lamprecht (45), aus Leber eine "Glycerinaldehyddehydrogenase" anzureichern, die D-Glycerinaldehyd zu D-Glycerinsäure umsetzt,

und von der er annimmt, dass sie identisch sei mit dem von Racker (46) beschriebenen Enzym "Aldehydoxydase", und dem nach Leuthardt, Testa und Wolf (32) bei der Disproportionierung des Aldehyds in Säure und Alkohol möglicherweise beteiligten Enzyms "Aldehydmutase", das von Green, Needham und Dewan (38) gefunden wurde. Die hierbei entstehende D-Glycerinsäure soll durch ein Enzym "Glyceratkinase" in 2-Phosphoglycerinsäure übergeführt werden, das ebenfalls von Lamprecht (40) aus Lebermitochondrien isoliert werden konnte (Siehe Schema Weg 3). Nach Lamprecht (40) soll dieses Enzym möglicherweise mit der Glyceratkinase von Holzer und Holldorf (37) Ichihara und Greenberg (44) sowie Black und Wright (43) identisch sein, da aus den Versuchen dieser Verfasser nicht eindeutig hervorgehe, dass das von ihnen isolierte Reaktionsprodukt wirklich 3-Phosphoglycerat gewesen sei. Diese zwei von Lamprecht aufgeklärten Reaktionsschritte ermöglichen für die Fruktose ein Reaktionsschema zu formulieren, das nur in sechs Schritten zur Brenztraubensäure führt und mit dem Abbauweg der Glukose nur mehr zwei Reaktionen gemeinsam hat.



Zusammenfassend lassen sich also für den Stoffwechselweg des beim Abbau der Fruktose entstehenden Glycerinaldehyds 3 Möglichkeiten erkennen, die man hinsichtlich der Bildung von Glycerin und α -Glycerophosphat wie folgt charakterisieren kann:

1. Bei dem früher von Leuthardt vorgeschlagenem Weg 1 entsteht direkt Glycerin, das über α -Glycerophosphat weiter zu DOAP umgesetzt wird.
2. Demgegenüber entsteht bei der von Holzer und Leuthardt vorgeschlagenen Dismutationsreaktion (Weg 2) kein Glycerin, sondern direkt Glycerophosphat bzw. α -Glycerinsäure, die zu 3-Phosphoglycerinsäure oder über Hydroxypyruvat

zu Serin umgesetzt werden kann.

3. Ebenso entsteht auch auf dem 3., von Lamprecht angegebenen Weg, auf dem der Glycerinaldehyd durch das Enzym "Glycerinaldehyd-dehydrogenase" in D-Glycerinsäure und weiter in 2-Phosphoglycerat umgesetzt werden soll, direkt kein Glycerin. Höchstens auf dem Wege einer Koppelung der Glycerindehydrase-Reaktion (=ADH) vermittelt des bei der Glycerinaldehyd-dehydrogenase-Reaktion entstehenden DPNH kann hierbei indirekt Glycerin aus freiem Glycerinaldehyd wie im ersten Stoffwechselweg gebildet werden.

Welcher von diesen 3 Stoffwechselwegen in vivo bevorzugt wird, müsste also durch das Auftreten oder Nichtauftreten von Glycerin bzw. Glycerophosphat nach Fruktosegabe zu entscheiden sein. Die nachfolgenden Versuche sollten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Bestimmung von Glycerin und α -Glycerophosphat in Rattenorganen nach i. p. -Fruktosegabe.

Die Glycerinbestimmungen wurden nach der enzymatischen Methode zur Bestimmung von Glycerin nach O. Wieland (1) durchgeführt. Sie erfolgten an Blut und Leberhomogenisaten von Ratten.

1) Organgewinnung: Das Tier wird in Nembutal-Narkose (0,2 ml i. p.) operiert, am lebenden Tier ein Leberlappen mit "Kältestopp" nach Th. Bücher sofort eingefroren und in flüssige Luft gebracht. Zum Kältestopp wird eine Tiegelfange verwendet, an die zwei Leichtmetallbacken gelötet wurden. Die Zange wird vor dem Gebrauch in flüssige Luft getaucht, und das Organstück, das man entnehmen will, mit der eiskalten Zange abgeklemmt, so dass es sofort einfriert. Hierdurch kann man postmortale Veränderungen weitgehend verhindern.

2) Gewinnung von Organextrakt: Die eingefrorene Leber wird mit dem 4fachen Volumen eiskalter 3% Perchlorsäure im Potter-Homogenisator aufgeschlossen. Zentrifugieren, den Niederschlag mit wenig Wasser nachwaschen. Das Filtrat wird mit 10 n KOH neutralisiert, das schwerlösliche K-Perchlorat durch Zentrifugieren abgetrennt. Der klare Überstand ist dann testfähig.

3) Gewinnung von Blutextrakt: Dem lebenden Tier wird nach Entnahme des Leberlappens die Vena cava caudalis punktiert und etwa 3 ml Blut mit einer Spritze abgezogen. Das Blut wird sofort mit einer eiskalten 5% Perchlorsäure im Verhältnis 1:1 enteiwisst. Zentrifugieren, und Nachwaschen des Niederschlages mit wenig H₂O. Das Filtrat wird mit 10 n KOH neutralisiert, das schwerlösliche KClO₄ durch Zentrifugieren abgetrennt. Der klare Überstand kann dann zum Test eingesetzt werden.

4) Zusammensetzung der Testansätze: 0,1 ml Extrakt, 1,75 ml Hydrazinpuffer (vgl. S. 8), 0,08 ml DPN 0,02 M, 0,05 ml ATP 0,1 M, 0,02 ml GDH-Boehringer (10 mg krist. Enzym/ml), etwa 200 Einheiten GK. - Man verfolgt

die DPNH-Bildung bis zum Stillstand.

Der Berechnung der Glycerinkonzentration (10) wurde der Absorptionskoeffizient von DPNH (3) bei 366 $m\mu = 3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ zugrunde gelegt. Nachdem in unserem Testsystem die Phosphorylierung von 1 Mol Glycerin mit der Bildung von 1 Mol DPNH einhergeht, errechnet sich die Glycerinmenge:

$$\text{Glycerin} = \frac{E_{366} \cdot \text{Testvolumen}}{3,3} \quad \mu\text{Mol im Ansatz}$$

5) Blutbestimmung: Um bei der Bestimmung des Glycerins den Fehler, der durch den Blutgehalt der Gewebe entsteht, auszuschalten, wurden jeweils Blutbestimmungen durchgeführt, wie sie von Holzer (42) für Rattenlebern beschrieben worden sind. Der Glyceringehalt des Blutes wurde von dem des Organes dann abgezogen.

6) Hemmung der GK durch Extrakte aus Rattenorganen: (s. Abb. 4). Bei der Bestimmung von Glycerin in Blut und Organextrakten zeigte sich, dass bei Einsatz von mehr als 0,1 ml Extrakt bei 2,0 ml Endvolumen in der Cuvette eine Hemmung auftritt, so dass bei Einsatz höherer Extraktmengen für Standarteinsetzungen von Glycerin zu niedrige Werte erhalten wurden. Diese Hemmung hat keinen Einfluss auf die Bildung von DOAP aus D- α -Glycerophosphat. Die Hemmung wurde gemessen, indem der Einfluss steigender Extraktkonzentrationen auf die GK-Kinetik verfolgt wurde. Das Cuvettenendvolumen betrug immer 2,0 ml. Alle Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Bestimmung der GK-Kinetik erfolgte durch minütliches Ablesen der Extinktionsdifferenz ΔE_{366} .

Die Natur des Hemmstoffes konnte nicht aufgeklärt werden. Eingehendere Versuche zeigten aber, dass er der Leber bzw. dem Blute selber angehören muss: Perchlorat kommt deshalb nicht in Betracht, da selbst eine Endkonzentration von $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ M KClO}_4$, die in den mit Perchlorsäure enteweißten Extrakten bei weitem nicht erreicht wird, die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms nur um 2% hemmt. Enteweißt man den Extrakt nicht mit Perchlorsäure, sondern durch 3 Minuten langes Kochen, so erhält man eine Hemmung, die in der gleichen Größenordnung liegt. (s. Tabelle 3).

TABELLE 3
Einfluss von Perchloratextrakt und Kochsaft auf die GK-Kinetik

	ml Einsatz bei konst. Endvolumen von 2,0 ml	% Hemmung
Perchlorat-Extrakt	0,1	17
	0,2	26
	0,5	53
	1,0	79
Kochsaft	0,1	0
	0,2	13
	0,5	37
	1,0	74

Die Kinetik des durch Kochsaft gehemmten Enzyms unterscheidet sich im Anfang von der durch Perchlorsäure gehemmten: Beim Perchlorat zeigt sich anfangs eine Steigerung, beim Kochsaft dagegen zeigt sich eine initiale Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit. Das mag durch den optischen Test beeinflussende Beimengungen bedingt sein.

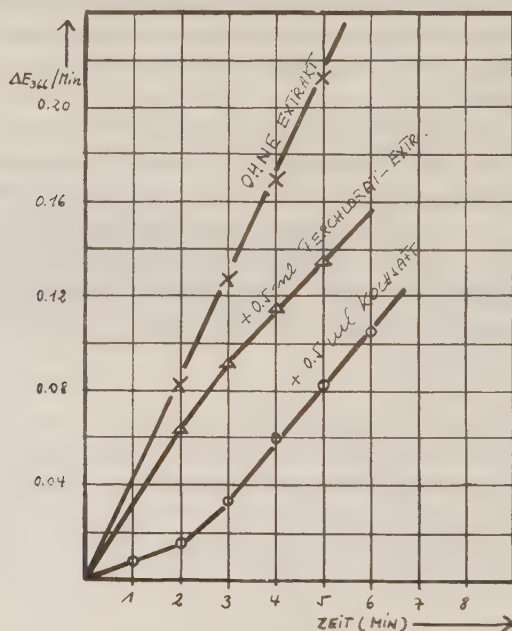


ABBILDUNG 4
Hemmung der GK durch Rattenorganextrakte

7) Versuche an Ratten: In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse von Versuchen dargestellt, bei denen Ratten 20 Minuten vor Organentnahme 2 ml 20% Fruktoselösung (Laevosan) i. p. injiziert wurden. Die Kontrolltiere bekamen 2 ml 20% Glukoselösung i. p.

Im Test kamen jeweils 0,1 ml Organextrakt zum Einsatz. Das Cuvettenendvolumen betrug immer 2,0 ml.

Glukoseversuch I

Fruktoseversuch I

	Eins. ml	Glyceroph. $\mu\text{M/g}$	Glycerin frisch	Eins. ml	Glyceroph. $\mu\text{M/g}$	Glycerin frisch
Leber:	0,05	-----	0,414	0,05	0,636	0,360
	0,1	0,187	0,332	0,1	0,640	0,360
	0,2	0,187	0,104			
Blut:	0,05	----- $\mu\text{M/ml}$	0,134	0,05	----- $\mu\text{M/ml}$	0,184
	0,1	-----	0,147	0,1	-----	0,184

Glukoseversuch II

Fruktoseversuch II

	Eins. ml	Glyceroph. $\mu\text{M/g}$	Glycerin frisch	Eins. ml	Glyceroph. $\mu\text{M/g}$	Glycerin frisch
Leber:	0,05	0,347	0,216	0,05	0,486	0,242
	0,1	0,347	0,216	0,1	0,486	0,242
Blut:	0,05	--- $\mu\text{M/ml}$	0,090	0,05	----- $\mu\text{M/ml}$	0,150
	0,1	---	0,090	0,1	-----	0,113

Ergebnisse im Blut:

Wie aus der oben stehenden Aufstellung ersichtlich ist, beträgt der Blutglycerinspiegel bei Ratten nach i. p. -Glukosegabe in dem einen Falle 1,29 mg%, in dem anderen 0,83 mg%. Diese Werte stimmen mit früheren überein (17).

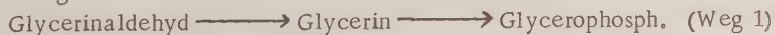
Nach i. p. -Fruktosegabe betrug der Glycerinspiegel des Blutes 1,96 mg% und 1,2 mg%. Es zeigte also nur der erste Wert eine deutliche Erhöhung gegenüber den Werten der Kontrolltiere.

α -Glycerophosphat konnte im Blut der Versuchstiere bei diesen Untersuchungen weder nach Glukose- noch nach Fruktosevorbehandlung gefunden werden.

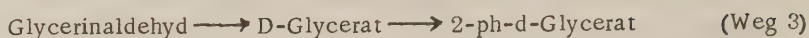
Ergebnisse in der Leber:

Der α -Glycerophosphatgehalt der Leber fand sich gegenüber den Kontrolltieren regelmässig erhöht.

Da keine Glycerinerhöhung gefunden wurde, kann dies als Hinweis dafür angesehen werden, dass in vivo als Hauptreaktionsweg des Glycerinaldehyds weder die Reaktionsfolge



von der Zelle eingeschlagen wird, noch die Reaktionsfolge



sondern dass die Hauptmenge des Glycerinaldehyds einer Dismutationsreaktion unterliegt, bei der direkt α -Glycerophosphat und D-Glycerinsäure entstehen:



Freilich könnte auch bei dem ersten Reaktionsweg indirekt Glycerinaldehyd entstehen, wobei dann allerdings unverständlich bleibt, weshalb nicht auch das Glycerin nachweisbar erhöht ist. Dasselbe gilt von der 3. Reaktionsfolge, wenn sie über das DPNH mit der 1. gekoppelt, und so zu einer zusammengesetzten Dismutationsreaktion ergänzt wird.

V. DISKUSSION

A. Der hier beschriebene Isolierungsgang von Glycerokinase aus *Oospora lactis* hat sich in mehreren Ansätzen als sicher reproduzierbar erwiesen. Trotz hoher Reinigungsgrade, die zum Teil weit über denen der kristallinen Fraktionen des Enzyms aus Taubenleber (2) lagen, konnte die GK aus *Oospora lactis* nicht in kristalliner Form dargestellt werden. Hieran mag der hohe Gehalt an Nukleinsäuren, den auch die höher gereinigten Fraktionen zeigten, Schuld sein. Es gelang nicht, die NS mit den üblichen Methoden, wie Fällung mit Protaminsulfat oder MnCl_2 abzutrennen.

In einigen seiner Eigenschaften stimmt das Enzym GK aus *Oospora lactis* völlig mit dem von Bublitz und Kennedy (1) aus Rattenleber angereicherten und dem von O. Wieland (2) aus Taubenleber isolierten Enzym überein. Es zeigt ebenfalls hohe Hitzestabilität und Mg^{++} -Bedürftigkeit. Seine pH-Stabilität dagegen liegt mehr im neutralen Bereich. Auch die Substrataffinität stimmt mit dem aus Taubenleber angereicherten Enzym für Glycerin und ATP grössenordnungsmässig überein, wie aus den ermittelten Michaelis-Konstanten hervorgeht. Nur DOA wird von dem hier angereicherten Enzym weniger umgesetzt, so dass ihm also eine grössere Substratspezifität für Glycerin zuzuerkennen ist.

B. Der Blutglycerinspiegel bei Ratten ergab die gleichen Werte wie bei früheren Untersuchungen (17). Dass nach i. p.-Fruktosegabe eine Erhöhung eintritt, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Hierzu wären zahlreichere Experimente erforderlich. Aber nach neueren Untersuchungen (48) fand sich auch beim Menschen nach Einnahme von 2 g Laevulose/kg Körpergewicht im Selbstversuch keine Veränderung des Glycerinspiegels im Serum. Der α -Glycerophosphat-Gehalt der Leber zeigte sich jedoch in beiden Versuchen gegenüber der Norm deutlich erhöht.

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass die GK aus *Oospora lactis* ebenso wie das Enzym aus Taubenleber geeignet ist, Glycerin enzymatisch nachzuweisen.

Diese Methode dürfte auch in der Klinik Anwendung finden. Der Anreicherungs-
gang ist verhältnismässig einfach, und das Ausgangsmaterial wirtschaftlich.

Überraschend war das Auftreten einer Hemmung der GK aus *Oo. lactis* durch
Extrakte aus Rattenorganen. Diese machte notwendig, mit kleinen Mengen Extrakt
zu arbeiten. Für die klinische Anwendung des Testes dürfte diese Hemmung aber
ohne Bedeutung sein, da sie bei Untersuchungen von menschlichem Blut nur in ge-
ringerem Ausmass aufzutreten scheint (48).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Enzym Glycerokinase wurde aus *Oospora lactis* isoliert und in hochgereinig-
ter Form dargestellt. Der Weg, der zur Auffindung von *Oo. lactis* als Ausgangs-
material führte, und das Anreicherungsverfahren werden im einzelnen beschrie-
ben.
2. Einige Eigenschaften des Enzyms werden untersucht, und die Michaelis-Kon-
stanten für Glycerin, ATP und DOA bestimmt.
3. Unter Verwendung von GK aus *Oo. lactis* zur enzymatischen Glycerinbestim-
mung werden Untersuchungen zum Stoffwechsel der Fruktose durchgeführt. Da-
bei ergab sich, dass nach Belastung mit Fruktose der Glycerophosphatgehalt
der Rattenleber zunimmt. Für Glycerin wurden keine eindeutigen Resultate
gewonnen. Die Versuche lassen in Übereinstimmung mit anderen Autoren
(13, 36, 37, 38) den Schluss zu, dass der aus dem Fruktoseabbau stammende
Glycerinaldehyd zum Teil über Glycerophosphat abgebaut wird, wobei es frag-
lich bleibt, ob die Stufe des Glycerins dabei durchlaufen wird.

VII. LITERATUR

- (1) Bublitz, C. and E.P. Kennedy:
J. biol. Chem. 211, 951 (1954)
- (2) Wieland, O. und M. Suyter:
Bioch. Z. 329, 320 (1957)
- (3) Hoffann-Ostenhof: Adv. Enzymol. 14, 219 (1953)
- (4) Külz, E.: Beiträge z. Pathologie u. Therapie d. Diabetes mellitus, Marburg 1874
- (5) Stuhlfauth, K.: Ärztl. Forsch. 5, 414 (1951)
- (6) Pletscher, A.: Helvet. Med. Acta 20, 100 (1953)
- (7) Leuthardt, F.: Therapiewoche 1955/56, S. 344
- (8) Leuthardt, F. u. E. Testa: Exposes annuel de Biochimie medicale 14, 33 (1952)
- (9) Wolf, H.P.: Diss. Zürich 1956
- (10) Renold, A.E. und G.W. Thorn:
Amer. J. Med. 19, 136 (1955)
- (11) Hers, H.G.: Le métabolisme du fructose. Bruxelles 1957
- (12) Wolf, H.P. und F. Leuthard:
Helvet. chim. Acta 36, 1463 (1953)
- (13) Leuthard, F.: 8. Coll. d. Ges. f. physiol. Chem. in Mosbach/Baden 1957 (Verl. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1958) S. 12, 13
- (14) Bücher, Th.: 8. Coll. Ges. physiol. Chem. Mosbach/Baden 1957, S. 25
- (15) Kennedy, E.P.: J. biol. Chem. 201, 399 (1953)
- (16) Wieland, O.: 8. Coll. Ges. physiol. Chem. Mosbach/Baden, 1957, S. 100
- (17) Wieland, O.: Biochem. Z. 329, 313 (1957)
- (18) Warburg, O.: Wasserstoffübertragende Fermente (Berlin, Verl. W. Saenger 1948)
- (19) Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czock, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und C. Pfeleiderer:
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

- (20) Caspersson, T.: Chromosoma 5, 562 (1940), J.R. microscop. Soc. 60, 8 (1940)
- (21) Merckenschlager, M., Schlossmann, K. und Kurz, W.: Biochem. Z. 329, 332 (1957)
- (22) Wortmann, J.: s.K. Myrbäck, Enzymatische Katalyse, Verlag Walter de Gruyter & Co., S. 10
- (23) Kalckar, H.M., B. Braganca u. A. Munch-Petersen: Nature 172, 1038 (1953)
- (24) King, T.C. u. V.H. Cheldelin: J. biol. Chem. 198, 135 (1952)
- (25) Burton, R.M. and N.O. Kaplan: J. Amer. chem. Soc. 75, 1005 (1953)
- (26) Asnis, R.E. and E.F. Brodie: J. biol. Chem. 203, 153 (1953)
- (27) Kunitz, M.: J. gen. Physiol. 35, 340 (1952)
- (28) Cherkin, A., F.E. Martinez, M.S. Dunn: J. Amer. chem. Soc. 75, 1244, (1953)
- (29) Tiselius u. Mitarbeiter: A.B.B. 65, 132 (1956)
- (30) Bergmeyer, H.O., G. Holz, E.M. Kauder, H. Möllering, O. Wieland: Biochem. Z. im Druck (1960)
- (31) Lineweaver, H. and D. Burk: J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934)
- (32) Leuthardt, F., E. Testa und H.P. Wolf: Helvet. chim. Acta 36, 227 (1953)
- (33) Leuthardt, F. und H.P. Wolf: Helv. chim. Acta 37, 1732 (1954)
- (34) Holzer, H. und S. Schneider: Angew. Chem. 67, 276 (1955); Klin. Wschr. 33, 1006 (1955)
- (35) Hers, H.G. et I. Kusaka: II^{me} Congrès Internat. de Biochimie Paris 1952; Résumés de Communicationes p. 281; Biochim. et Biophys. Acta 11, 427 (1953)
- (36) Leuthardt, F., E. Testa und H.P. Wolf: Helvet. physiol. Acta 10, C 57 (1952)

- (37) Holzer, H. und A. Holldorf:
Biochem. Z. 329, 283 (1957)
- (38) Green, E., D.M. Needham and J.G. Dewan:
Biochem. J. 31, 2327 (1937)
- (39) Ichihara, A. and D.M. Greenberg:
J. biol. Chem. 224, 331 (1957)
- (40) Lamprecht, W.: Europ. Symp. on Med. Enzymology, Mailand, 1960
(C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim 1960)
- (41) Holzer, H. und A. Holldorf:
Biochem. Z. 329, 292 (1957)
- (42) Holzer, H.: 8. Coll. Ges. physiol. Chem. Mosbach/Baden 1957
S. 24
- (43) Black, S. and N.G. Wright:
Federation proc. 15, 222 (1956)
- (44) Ichihara, A. and D.M. Greenberg:
J. biol. Chem. 225, 949 (1957)
- (45) Lamprecht, W. und F. Heinz:
Z. Naturforsch. 13 b, Heft 7 (1958)
- (46) Racker, E.: J. biol. Chem. 177, 883 (1949)
- (47) Holzer, H.: Biochem. Z. 239, 117 (1957); Holzer, H., G. Sedl-
mayr, M. Kiese: Biochem. Z. 328, 176 (1956)
- (48) Feigenbutz, W.: Dissertation München 1960
- (49) Grassmann, W., Hanning, K. und Knedel, M.:
Dtsch. Med. Wschr. 76, 333 (1951); Grassmann, W. und
K. Hanning: Z. physiol. Chem. 290, 1 (1952)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 14. November 1934 in Guatemala (Central-Amerika) als Tochter des Überseekauffmanns Bruno Kauder geboren.

1953 Abitur an der Kippenbergschule in Bremen, Oberrealgymnasium für Mädchen.

Vorklinisches Studium in Marburg/Lahn. 1956 Physikum in Marburg/Lahn.

Klinisches Studium in München. 1959 Staatsexamen in München.

1958 Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Professor Dr. O. Wieland.

Seit 1. März 1960 Medizinalassistentin, zunächst an der II. Med. Klinik der Universität München, seit dem 9. Juni an der II. Med. Abteilung des Krankenhauses Schwabing, München.



